Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | ヒト血小板のCa2+依存性中性蛋白分解酵素に対する内在性阻害蛋白質の精製と性質 |
| Author(s) | 芝, 英一 |
| Citation | 大阪大学, 1984, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/34787 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【65】

| | |
|---|---|
| 氏名・（本籍） | 芝（しば）　英（えい）一（いち） |
| 学位の種類 | 医　学　博　士 |
| 学位記番号 | 第　6676　号 |
| 学位授与の日付 | 昭和59年12月27日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当 |
| 学位論文題目 | **ヒト血小板の $Ca^{2+}$ 依存性中性蛋白分解酵素に対する内在性阻害蛋白質の精製と性質** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授　森　武貞<br>（副査）<br>教授　坂本　幸哉　教授　垂井清一郎 |

（目　的）

$Ca^{2+}$依存性中性蛋白分解酵素（$Ca^{2+}$－activated neutral protease ： CANP ）は，$Ca^{2+}$で活性化され，中性域にその至適pHを有するチオールプロテアーゼである。CANPの生理的役割は未だ十分に解明されていないが，内因性基質として筋蛋白質，ある種の酵素，細胞構築蛋白が報告され，また骨格筋，心筋，赤血球よりCANPに対する特異的阻害蛋白質（CANP−INH）が精製されている。教室の左近，[1] 辻仲[2]は，血小板の細胞質中に，$Ca^{2+}$感受性の異なる二種のCANP，すなわち，μMレベルの$Ca^{2+}$濃度で活性されるμ−CANPとmMレベルの$Ca^{2+}$濃度で活性化されるm−CANPが存在すること，また血小板には内在性のCANP−INHが存在することを明らかにした。本研究はヒト血小板CANPに対するCANP−INHの調節機構を明らかにするために，ヒト血小板よりCANP−INHを精製し，その諸性質について検討を加えたものである。

（方法ならびに成績）

1. CANP−INH活性の測定

CANP−INH活性は，試料と一定量のCANPを25℃で10分間インキュベートし，0.5％熱変性カゼインを基質として，2 mM $CaC\ell_2$存在下20℃，pH 7.5の条件で，20分間反応させ，トリクロル酢酸を含む停止液にて反応を止めた後，遠心し，上清のペプチドをフルオレスカミンを用いた蛍光法で測定した。既知の量のCANPの阻害活性よりCANP−INH活性を表現した。

2. CANP−INHの精製

ヒト洗浄血小板（$5.0 \times 10^{11}$）を破壊し，105.000 ×gの遠心上清を得た。CANP−INHがきわめて

耐熱性蛋白であることを利用し，80℃15分間の熱処理を加え，変性蛋白を遠心にて除去した。この上清のO—70%硫安飽和沈澱分画を，DEAE-Sepharose CL-6Bカラムにかけ，O—0.4 M NaCℓの直線塩濃度勾配で溶出した。NaCℓ濃度0.2 MでCANP-INH活性が溶出されたが，CANP活性は熱処理によって失活し，検出されなかった。CANP-INH活性を有する分画に2回目の熱処理（95℃，15分間）を加え，変性蛋白を遠心にて除去後，上清を凍結乾燥し，緩衝液にて溶解した。これを透析し，Ultrogel AcA34にてゲル沪過を行なったところ，CANP-INH活性は，二つのピークに分離され，それぞれ分子量250 Kと60Kに相当した。しかしSDS-PAGEにかけると，二つの分画はいずれも63Kの単一バンドを示し，血小板CANP-INHは四量体および単量体として存在することが示唆された。

3. CANP-INHの諸性質

CANP-INHによるCANP活性阻害に対する$Ca^{2+}$の影響を明らかにするため，一定量の精製されたμ-CANP[3]に種々の濃度の$Ca^{2+}$存在下でCANP-INHを加え，CANP活性の阻害を調べた。過剰の$Ca^{2+}$を添加してもCANP-INHによる阻害は解消されず，またμM濃度の$Ca^{2+}$存在下でも阻害が認められた。次いで精製CANP-INHが他のプロテアーゼに与える影響を検討したが，α—キモトリプシン，プラスミン，パパイン，フィシンを阻害せず，CANPを特異的に阻害するものと考えられた。精製CANP-INHの精製μ-CANPに対する阻害形式を，基質として0.0375%，0.075%の熱変性カゼインを用い，Dixon plotにて解析したところ，阻害形式は非競合的であり，Ki値は$3.2 \times 10^{-8}$Mであった。また部分精製したm-CAPに対してもmM濃度の$Ca^{2+}$存在下で阻害を示した。

（総　括）

ヒト血小板よりCANP-INHを均一に精製した。CANP-INPは63Kの単量体と63K×4の四量体で存在していることを示すデータがえられ，従来のCANP-INHの分子量に関する報告（ニワトリ骨格筋で68K，ヒト赤血球とウシ心筋で250—400 K）の相異を説明することが可能となった。ヒト血小板CANP-INHはCANPに特異的で，μMレベルの$Ca^{2+}$濃度でもμ-CANPを阻害した。したがってCANP-INHは細胞内でCANP活性を調節する役目をもつものと考えられる。またCANP-INHのCANPに対する阻害は$Ca^{2+}$をキレートして阻害するものではなく，その阻害形式は，Dixon plotにより非競合的阻害を示し，Ki値は$3.2 \times 10^{-8}$Mであった。

文　献

1）M. Sakon, et al. Experientia, 38 : 1099, 1982.
2）T. Tujinaka, et al. Thromb. Res., 28 : 149, 1982.
3）T. Tujinaka, et al. Biochem, Int., 6 : 71, 1983.

## 論文の審査結果の要旨

本研究は，ヒト血小板より初めて$Ca^{2+}$依存性中性蛋白分解酵素（CANP）に対する内在性阻害蛋白質（CANP-INH）を均一に精製し，その性質を調べたものである。その結果血小板CANP-INHは主とし

て tetramer として存在するが，monomer としても存在していること，CANP–INH の$\mu$–CANPに対する阻害は，生理的細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度で働くことなどが明らかにされた。これらの知見は，CANP ならびに CANP–INH の生理作用を考えるうえで重要であり，学位に価する。